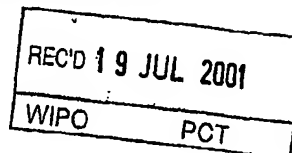


PCT/EP 01/03412

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2A-1-9
533

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 14 690.2

Anmeldetag: 24. März 2000

Anmelder/Inhaber: Dr. Wolfgang M. Franz, Groß Grönau/DE

Bezeichnung: Verfahren zu Isolierung in vito differenzierter Körperzellen

IPC: C 12 N 15/63

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 2. Juli 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Nietfeldt

Verfahren zur Isolierung in vivo differenzierter Körperzellen

5

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Verfahren zur Herstellung und selektiven Isolierung differenzierter, transgener, somatischer Körperzellen, wie z.B. ventrikulärer Kardiomyocyten, die dazu erforderlichen genetischen Konstrukte und die damit hergestellten Vektoren, diese Vektoren enthaltende Wirtszellen und die therapeutische Verwendung der transgenen differenzierten Körperzellen.

Es besteht auf verschiedensten Gebieten der Medizin, wie z.B. der Neurologie, der Dermatologie, der Osteologie oder der Kardiologie ein Bedarf an allogenem oder syngenen Ersatzgewebe oder Ersatzzellmaterial. Man befaßt sich deshalb intensiv mit der Gewinnung differenzierter somatischer Körperzellen aus pluripotenten Progenitorzellen, wie z.B. embryonalen Stammzellen. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind der Wissenschaft schon seit geraumer Zeit bekannt. Am Modell der Maus wurden sie charakterisiert. Sie besitzen die außerordentliche Fähigkeit, sich im wesentlichen in jede der 210 verschiedenen Zelltypen des menschlichen Körpers zu differenzieren.

Thomson et al (1998), Science 282, 1145-1147 ist es kürzlich gelungen, menschliche ES-Zellen aus menschlichen Blastozysten zu isolieren. In ihren physiologischen Eigenschaften gleichen sie denen der Maus. Mit der Isolierung menschlicher ES-Zellen rückt eine erfolgreiche zellvermittelte Gentherapie am Menschen in greifbare Nähe. Die Bedeutung dieser Entwicklung soll am Beispiel der Kardiologie kurz veranschaulicht werden.

Herzinsuffizienz beschreibt die Unfähigkeit des Herzens, Blut und Sauerstoff in einem Maße, das den Bedürfnissen des Körpers gerecht wird, zu den Organen zu transportieren. 1996 starben in Deutschland mehr Menschen an chronischer Herzinsuffizienz als

an akutem Herzinfarkt. Hauptursache dafür ist, daß zu wenig Spenderherzen für eine lebensrettende Herztransplantation zur Verfügung stehen und die Wartezeit derzeit bei etwa neun bis zwölf Monaten liegt.

5

Die derzeit zur Verfügung stehenden Alternativmethoden zur Herztransplantation sind nur begrenzt erfolgreich bzw. nicht weit genug entwickelt. Zur Myokardentlastung und Kontraktionsunterstützung wird im klinischen Alltag in einem ersten Schritt vor allem die medikamentöse Therapie der chronischen Herzinsuffizienz angewandt. Es folgen operative Maßnahmen, wie die Myokardresektion nach Batista, nach welcher geschädigtes Gewebe mechanisch entfernt wird, die Kardiomyoplastie, d.h. der Unterstützung der Herzfunktion durch körpereigene Skelettmuskulatur sowie die Implantation eines Kunstherzes. In der experimentellen Phase befindet sich immer noch die umstrittene Xenotransplantation, also die Verpflanzung eines Spenderherzens aus dem Schwein oder dem Affen in den Menschen. Letztere trifft nicht nur auf ethische Einwände, sondern auch auf medizinische Risiken, die mit einer Xenotransplantation verbunden sind. Zum einen kann ein Überspringen artfremder Krankheitserreger auf den Menschen nicht ausgeschlossen werden. Andererseits setzt eine Xenotransplantation immer noch die Verwendung immunsupprimierender Medikamente voraus, die zwar das transplantierte Herz vor einer Immunreaktion schützen, den Gesamtorganismus aber gegenüber alltäglichen Keimen und der Entstehung von Krebs verwundbar machen.

Die wohl erfolgversprechendste Alternative zur Herztransplantation wäre die autologe Zelltransplantation. In der Kardiologie versteht man darunter die Injektion von gesunden Zellen direkt in das geschädigte Herzareal.

Kardiomyozyten verlieren im Gegensatz zur quergestreiften Skelettmuskulatur kurz nach der Geburt die Fähigkeit sich zu teilen, so daß bei einer Verletzung oder Schädigung des Myokards irreversible Zell- und Funktionsverluste auftreten. Im Falle

eines Herzinfarktes bedeutet dies den Ersatz von Herzmuskulatur durch Bindegewebe mit Bildung einer Narbe. Dem könnte durch die Transplantation von Ersatz-Muskelzellen entgegengewirkt werden.

- 5 Die technische Durchführbarkeit der zellulären Transplantation in Versuchstiere, wie Maus, Ratte und Hund, konnte nicht nur durch die Transplantation von fetalen, neonatalen und adulten Kardiomyozyten, sondern auch durch die Injektion organfremder Zellen wie, Myoblasten, Skelettmuskel-Satellitenzellen und kardialen Tumorzellen bewiesen werden (Klug et al., (1996) J.Clin. Invest. 98, 216); Koh et al., (1995) J. Clin. Invest. 96, 2034; Schwarz et al., (1998) Z. Kardiol, 87, 1). Histologisch-morphologische Studien belegen, daß sowohl Myoblasten, als auch fetale Kardiomyozyten myokardiale Transplantate mit interzellulären Verbindungen, wie "Gap Junctions" und Desmosomen, ausbilden und 8 bis 10 Wochen überleben (Koh et al., a.a.O; Soonpaa et al., (1994) Science, 264, 98). Koh und Mitarbeiter konnten zeigen, daß genetisch modifizierte, transplantierte Myoblasten im Empfängermyokard rekombinante Wachstumsfaktoren langfristig exprimieren und dadurch im Grenzbereich zwischen Transplantat und Empfängermyokard die endotheliale DNA-Synthese mit nachfolgender Angiogenese induzieren können (Koh et al., (1995) J. Clin. Invest. 95, 114). Teilweise ungeklärt ist, ob die Zelltransplantate wirklich positive Effekte auf das Myokard ausüben oder nicht längerfristig etwa elektrische und strukturelle Instabilitäten verursachen. Problematisch bei der Gewinnung von Kardiomyozyten ist die Manipulation der Zellen. Zwar gelingt es, Kardiomyozyten zurück in den Zellzyklus zu zwingen, z.B. durch das Einfügen von Tumorgenen, jedoch auf Kosten der physiologischen Zelleigenschaften. Die für ventrikuläre Kardiomyozyten typischen elektrophysiologischen, pharmakologischen und immunhistologischen Charactersitika gehen dadurch verloren.

- Grundvoraussetzung für den Erfolg eines Zelltransplantationsansatzes ist das Vorhandensein einer homogenen Zellpopulation. ES-Zellen besitzen neben ihrer Fähigkeit sich in jedweden Zelltyp zu differenzieren, auch einen besonderen Nachteil. Werden

sie in undifferenziertem Zustand in Mäuse injiziert, so kommt es zur Entstehung von Tumoren, sogenannten Teratokarzinomen. Bevor ES-Zellen therapeutisch genutzt werden können, muß daher sichergestellt sein, daß alle Zellen so ausdifferenziert sind, daß keine Gefahr vor einer ungehemmten Vermehrung der Zellen oder der Bildung ungewollter Gewebstypen besteht. Eine stringente Aufreinigung des gewünschten Zelltyps, im Falle der Kardiologie, von Herzmuskelzellen, ist daher zur Sicherheit des Empfängers eine absolute Notwendigkeit.

10

Loren J. Field (J. Clin. Invest. (1996), 98, 216) gelang es, spontan differenzierende Kardiomyozyten mit einem Reinheitsgrad von über 99% anzureichern. Um dieses Ziel zu erreichen, führten sie zunächst ein Antibiotika-Resistenzgen in die murinen ES-Zellen ein. Dieses war so ausgelegt, daß es ausschließlich in Kardiomyozyten exprimiert wird. Nachdem den ES-Zellen Zeit gegeben wurde, sich zu differenzieren und nachdem durch den Zusatz von genügend Antibiotikum alle Zellen ohne Resistenzgen abgetötet waren, gelang es, eine im wesentlichen reine Population von Kardiomyozyten zu erhalten. Nach der Transplantation dieser Zellen in Mäusemyokardien, konnten sie bis zu einem Zeitraum von mehr als 7 Wochen nachgewiesen werden. Die Hauptnachteile dieser Methode bestehen vor allem in der Toxizität des verwendeten G418-enthaltenden Mediums, der geringen Ausbeute der so erhaltenen Zellen und der Tatsache, daß es sich bei den beschriebenen Zellen nicht um humane sondern murine Zellen handelt.

30

Obwohl Kardiomyozytentransplantation am Tiermodell mehrfach erfolgreich durchgeführt wurden, ist eine erfolgsversprechende Durchführung am Menschen aus obigen Gründen und vor allem aufgrund der Nichtverfügbarkeit menschlicher ventrikulärer Kardiomyozyten nicht möglich. Mit ähnlichen Problemen ist bei der Gewinnung und Transplantation anderer Körperzellen zu rechnen.

35

Kurze Beschreibung der Erfindung:

Es ist deshalb Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein verbessertes Verfahren zur Gewinnung von differenzierter Körperzellen zur Verfügung zu stellen. Insbesondere war es Aufgabe, ein Verfahren zur Gewinnung differenzierter ventrikulärer Kardiomyocyten bereitzustellen.

Obige Aufgabe wurde überraschenderweise durch Bereitstellung einer Expressionskassette für die genetische Modifikation der zu isolierenden Körperzellen, bzw. pluripotenter Vorläuferzellen der Körperzellen gelöst. Diese Expressionskassette ist dadurch gekennzeichnet, dass sie unter der genetischen Kontrolle eines organ- oder gewebespezifischen Promotors sowie gegebenenfalls eines oder mehrerer weiterer regulatorischer Elemente 3'-stromabwärts vom Promotor, funktional bzw. operativ verknüpft, die kodierende Nucleotidsequenz wenigstens eines nicht-immunogenen Genes an der Zelloberfläche lokalisierenden Rezeptors umfasst.

Durch die Kombination von spezifischem Promotor und an der Zelloberfläche lokalisierenden Rezeptor wird eine schnelle, schonende und selektive Isolierung einer spezifischen Zellpopulation unter Ausnutzung der Bindungsaffinität des Rezeptors zu einem korrespondierenden Bindungspartner bzw. Liganden ermöglicht.

Detaillierte Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen der Erfindung:

Je nach zu isolieren gewünschter Zellpopulation kann der Fachmann den jeweils geeignetsten zell- oder organspezifischen Promotor und einen passenden Rezeptor auswählen.

Als nichtlimitierende Beispiele für geeignete Promotoren sind zu nennen:

Promotor	Spezifität	Fundstelle
MLC-2	Herzmuskel	PCT/DE 96/02181
SMHC	Glatte Gefäßmuskel	DE-A-196 20 308
Insulinpromotor	Beta-Zellen	
AFP-Promotor	Leber	

Auf die Offenbarung obiger Fundstellen wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

Entscheidend für die Auswahl des Rezeptors ist, daß dieser nach Expression auf der Zelloberfläche Bindungsaffinität zu einem Liganden besitzt und geringe Immunogenität in einem späteren Empfängerorganismus aufweist. Vorzugsweise sollte der Rezeptor vom Immunsystem des Empfängerorganismus nicht als "körperfremd" erkannt werden.

Beispiele für geeignete Ligand/Rezeptorpaare sind:

Rezeptor	Ligand
CD4	Anti-CD4-Antikörper

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist dadurch gekennzeichnet, daß die kodierende Nucleotidsequenz in einem polycistronischen, vorzugsweise bicistronischen, Gen enthalten ist, welches außerdem die kodierende Sequenz für wenigstens ein weiteres Genprodukt, ausgewählt unter einem Markergen und einem ersten therapeutischen Gen, umfasst. Vorzugsweise umfasst das bi-cistronische Gen die regulatorische Sequenz einer Internal Ribosome Entry Side (IRES) (z.B. kommerziell erhältlich von der Firma Clontech).

Ein derartiges Konstrukt bietet den zusätzlichen überraschenden Vorteil, daß unter der genetischen Kontrolle des vorgeschalteten Promotors eine gleichzeitige Expression des Rezeptors und des weiteren Gens erfolgt. Ist das weitere Gen ein Markergen, wie z.B. EGFP (grün fluoreszierendes Protein), so erleichtert dies die Charakterisierung der mit Hilfe des Rezeptors isolierten Zellen. Ist das weitere Gen ein therapeutisches Gen, so wird dessen gewebe- oder organspezifische Expression gewährleistet und dadurch das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen durch unkontrollierte Expression in anderen Geweben oder Organen praktisch ausgeschlossen.

Neben dem Promotor können in der Expressionskassette gewünschtenfalls weitere regulatorische Elemente enthalten sein, wie Amplifikationssignale, Enhancer, Polyadenylierungssequenzen, Replikationsursprünge, Reportergene, Markergene und dergleichen.

Bevorzugt verwendet man in den erfindungsgemäßen Konstrukten als Rezeptormolekül ein Oberflächenantigen, das immunologische Affinität zu einem Immunglobulin-Molekül besitzt. Das Immunglobulinmolekül ist dabei vorzugsweise ein monoklonaler Anti-Rezeptor-Antikörper oder ein Rezeptor-bindendes Fragment, wie z.B. ein Fab oder F(ab')₂ oder Fv Fragment, davon.

Zur leichteren Isolierung der Rezeptor-exprimierenden Zellen kann der Ligand, wie z.B. der Antikörper, in immobilisierter Form, z.B. gebunden an einen festen Träger, oder verknüpft mit paramagnetischen Mikrokügelchen, sogenannte "Mikrobeads", vorliegen.

Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet man als Oberflächenantigen das CD4-Antigen oder ein verkürztes Fragment davon, vorzugsweise ein um die intrazelluläre Domäne verkürztes Molekül, das somit weiterhin die Transmembran- und extrazelluläre Domäne umfasst.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann die Expressionskassette einen selektierbaren Marker, wie z.B. ein Resistenzgen enthalten. Grundsätzlich sind beliebige an sich bekannte Resistenzgene einsetzbar. Als Beispiele können insbesondere Antibiotika-Resistenzgene, wie das Neomycin- und das Hygromycin-Resistenzgen, genannt werden.

Vorzugsweise liegt das Resistenzgen und dessen zugeordneter Promotor in einer reversibel integrierten Form vor und kann somit zu einem geeigneten Zeitpunkt, jedenfalls vor der therapeutischen Anwendung der Zellen, wieder entfernt werden. Die reversible Einbindung von Resistenzgen und dessen Promotor erreicht man beispielsweise, indem man diese durch LoxP-Sequenzen flankiert (LoxP-Promotor-Resistenzgen-LoxP). Durch transiente Transfektion der Resistenzgen-haltigen Zellen und Expression von PKG-Cre (z.B. beschrieben in Cellemann et al., (1998) Transg. Res. 7, 105) kann damit das Fremdgen spezifisch entfernt werden.

Als Beispiel für eine erfindungsgemäß brauchbare Gruppe erster therapeutischer Gene sind Gene für Angiogenese-Faktoren zu nennen. Bevorzugte Vertreter dieser Gruppe sind das vascular endothelial growth factor (VEGF) Gen, das basic fibroblast growth factor (bFGF) Gen, das acidic fibroblast growth factor (aFGF) Gen, das Angiopoietin-, Activin- sowie das Follicostatin-Gen. Diese sind vorzugsweise Bestandteil des oben erwähnten bi-cistronischen Gens.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Konstrukt außerdem ein zweites therapeutisches Gen, insbesondere ein Immunsuppressionsgen.

Vorzugsweise ist dieses Gen in eigenständiger Form, d.h. mit einem eigenen Promotor, enthalten. Derartige Konstrukte bieten den Vorteil, daß eine lokale immunsuppressive Wirkung gentherapeutisch vermittelt werden kann. Das immunsupprimierende Genprodukt kann dabei membranständig oder, vorzugsweise, in sezernierbarer Form vorliegen.

nierter Form vorliegen. Ein geeignetes sezerniertes immunsupprimierendes Genprodukt ist das CTLA4-Ig-Fusionsprotein.

Aufgrund der bevorzugten therapeutischen Verwendung der erfindungsgemäßen Zellisolate beim Menschen sind insbesondere solche Konstrukte vorteilhaft, deren kodierenden Sequenzen im wesentlichen für humane oder humanisierte Genprodukte kodieren. "Humanisierte" Genprodukte sind dabei solche, bei denen zur Verringerung ihrer Immunogenität nicht-menschliche Teilsequenzbereiche durch entsprechenden mensch-typische Sequenzbereiche ersetzt wurden.

Eine besonders bevorzugte Gruppe von erfindungsgemäßen Expressionskassetten ist dadurch gekennzeichnet, dass als organ- oder gewebespezifischer Promotor der ventrikelspezifische Myosin-Leichte-Kette-2 (MLC-2v) Promotor verwendet wird. Dieser Promotor und geeignete Varianten davon sind in der PCT/DE 96/02181 beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird. Beispiele für spezielle Formen bevorzugter Expressionskassetten sind Konstrukte, welche in 5'-3'- Richtung wenigstens eine der folgenden Teilsequenzenfolgen umfassen:

- a) MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor;
- b) CMV-Enhancer, MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor;
- c) CMV-Enhancer, MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor, PGK-Promotor, CTLA4-Ig Fusionsprotein; und
- d) CMV-Enhancer, MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor, LoxP, PGK-Promotor, Resistenzgen, LoxP, PGK-Promotor, CTLA4-Ig Fusionsprotein;

dabei ist der CMV-Enhancer ein regulatorisches Element aus dem Cytomegalovirus und der PGK-Promotor die Promotorsequenz für das Enzym Phosphoglycerinkinase. Auch diese bevorzugten Konstrukte umfassen zweckmäßig kodierende Sequenzen, welche im wesentlichen für humane oder humanisierte Genprodukte kodieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Vektoren, wie z.B. Plasmide oder virale Konstrukte, Phagen, Phasmide, Phagemide, Transposons, Cosmide, oder Liposome, umfassend wenigstens eine der oben beschriebenen Expressionskassetten. Bevorzugt verwendet man virale, insbesondere adenovirale, Konstrukte oder Liposomenpräparate. Bevorzugte MLC-2-haltige Vektoren sind in der oben bezeichneten PCT/DE 96/02181 beschrieben.

Weiterhin ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Isolierung in vitro differenzierter organ- oder gewebespezifischer Körperzellen eines Säugers, wobei man

a) in pluripotente Vorläuferzellen, ausgewählt unter embryonalen Stammzellen, Primordialzellen und Knochenmarks-Stromazellen eines Säugers, einen organ- oder gewebespezifischen Expressionsvektor gemäß obiger Definition einbringt;

b) transgenpositive Zellen selektioniert;

c) aus den selektionierten Zellen gegebenenfalls vorhandene Resistenzgene entfernt;

d) in den so erhaltenen Zellen die Differenzierung zu einer Population der gewünschten organ- oder gewebespezifischen Körperzellen

umfassenden Zellpopulation induziert und erforderlichenfalls eine Einzelzellpräparation herstellt; und

e) die Rezeptor-exprimierenden differenzierten Körperzellen mit Hilfe Rezeptor-spezifischer Liganden affinitätsreinholt.

Gegenstand ist insbesondere auch ein Verfahren zur Herstellung von ventrikulären Kardiomyozyten, wobei man

a) in pluripotente Vorläuferzellen, ausgewählt unter embryonalen Stammzellen, Primordialzellen und Knochenmarks-Stromazellen eines Säugers, einen oben beschriebenen ventrikelspezifischen Expressionsvektor einbringt;

b) transgenpositive Zellen selektioniert;

c) aus den selektionierten Zellen gegebenenfalls vorhandene reversibel integrierte Resistenzgene entfernt;

d) in den so erhaltenen Zellen die Differenzierung zu einer Kardiomyocyten umfassenden Zellpopulation induziert und

erforderlichenfalls eine Einzelzellpräparation herstellt;
und

- e) die Rezeptor-exprimierenden differenzierten ventrikulären Kardiomyozyten mit Hilfe Rezeptor-spezifischer Liganden
5 affinitätsreinigt.

Eine Variante obiger Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man als reversibel integrierte Resistenzgene LoxP-flankierte Resistenzgene verwendet, und zur Entfernung dieser die Zellen
10 mit einem Cre-Rekombinase kodierenden Expressionsvektor transient transfiziert.

In einer weiteren Variante obigen Verfahrens werden embryonale Stammzellen eingesetzt, die in an sich bekannter Weise gewonnen
15 wurden aus

- a) Blastozysten oder
b) enukleierten Oocyten, in welche der Kern einer differenzierten adulten somatischen Körperzelle transferiert wurde.
20

Vorzugsweise sind bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die Rezeptor-spezifischen Liganden an paramagnetische Microbeads gekoppelt, so daß die Ligand-markierten Zellen in einem Magnetfeld von nichtmarkierten Zellen getrennt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist grundsätzlich mit pluripotenten Stammzellen beliebiger Säuger, wie z.B. Mensch, Maus, Ratte, Schwein, Rind, Hund, Kaninchen, Hamster, durchführbar.

30 Obige Verfahren finden insbesondere Anwendung zur Herstellung körpereigener (autologer) humaner Körperzellen, wobei man die pluripotenten Vorläuferzellen aus einem autologen menschlichen Spender gewinnt.

35 Gegenstand der Erfindung sind insbesondere transgene somatische Körperzellen, erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren. Diese finden insbesondere Verwendung zur, vorzugsweise

autologen, Zelltransplantation oder zur Gentherapie, wie insbesondere zur zellvermittelten Gentransplantation, bei verschiedensten Krankheitszuständen. Nichtlimitierende Beispiele für mögliche Indikationen sind die ischämische und dilatative
5 Kardiomyopathie.

Gegenstand sind insbesondere Kardiomyocyten mit einem elektrophysiologisch ventrikulären Eigenschaftsspektrum, d.h. einem für ventrikuläre Kardiomyocyten typischen Membranpotential von ca.
10 -70 mV, einer Potentiallänge von ca. 118 ms und einem Overshoot von ca. 34 mV, wobei Carbachol als Agonist des Muscarinischen Rezeptors keinen Effekt auf das Membranpotential und die Länge des Aktionspotentials hat. Typisch für ventrikuläre Kardiomyocyten ist außerdem ein Andauern des Aktionspotentials nach Behandlung der Zellen mit dem beta-adrenergen Agonisten Isoprenalin (vgl. auch Figur 2).
15

Die Herstellung und Gewinnung von Herzmuskelzellen aus verschiedenen pluripotenten Progenitorzellen wird nun im folgenden
20 Abschnitt eingehender beschrieben.

a) Herstellung aus ES-Zellen:

Das derzeitige Wissen über die Gewinnung und Handhabung von ES-Zellen stammt zum größten Teil aus dem Studien muriner ES-Zellen. Sie wurden erstmals 1981 aus einem Maus-Embryo im 100-Zellstadium gewonnen. Der Embryo in diesem Entwicklungszeitpunkt wird als Blastozyste bezeichnet. Er mißt wenige Millimeter und besteht aus einer Hohlkugel, die an einer Stelle nach
30 innen zur inneren Zellmasse verdickt ist. Unter natürlichen Verhältnissen bildet sich im Uterus daraus der Fötus. Wird die Blastozyste allerdings in einer Petrischale angewachsen, so kollabiert die äußere Membran und die innere Zellmasse fängt an sich zu teilen. In diesem Stadium können die Zellen über einen
35 unbegrenzten Zeitraum gehalten werden. Ihre Pluripotenz, d.h. ihre Fähigkeit sich in nahezu jeden Zelltyp zu differenzieren bleibt weiterhin erhalten.

Die ES-Zellen behalten solange ihren undifferenzierten Zustand bei, solange sie in ihrem Nährmedium das von sogenannten "Feeder"-Zellen sezernierte Cytokin LIF (Leukemia Inhibitory Factor) vorfinden. Werden die "Feeder"-Zellen bzw. LIF entfernt und wird verhindert, daß sich die ES-Zellen am Substrat anheften, z.B. durch Kultur der ES-Zellen auf Bakterienplatten oder in sogenannten "hängenden Tropfen", so beginnen sie sich zu differenzieren. Während der Differenzierung kommt es zur Ausbildung sogenannter "Embryoid Bodies". Die Richtung der Differenzierung bleibt zunächst unvorhersehbar, jedoch ist das Repertoire sich in vitro differenzierender Zellen deutlich geringer, als nach Injektion in eine Blastozyste; vermutlich hervorgerufen durch die unterschiedlich chemisch definierte Umgebung der Zellen. Werden die ES-Zellen in Gegenwart von Stromazellen angewachsen, so kommt es zu einer verstärkten Ausbildung hämatopoetischer Zellen. Das gleiche tritt ein, wenn dem Kulturmedium Methylcellulose beigelegt wird. Die Zugabe von Retinsäure (RA) führt je nach Konzentration und Zeitpunkt der Stimulation zur Anhäufung kardialer oder neuronaler Zellen. Entsprechende Methoden sind z.B. in der DE 44 41 327 oder der WO 96/16163 beschrieben.

Von kleineren Abweichungen im Arbeitsprotokoll abgesehen, ist die obige für murine ES-Zellen beschriebene Handhabungs- und Differenzierungsprozedur auch für humane ES-Zellen anwendbar. Während bei murinen Blastozysten nach Beginn der in vitro Differenzierung die äußere Zellschicht (Trophoblast) relativ schnell abgebaut wird, ist dies bei humanen Blastozysten nicht der Fall. Um die innere Zellmasse vor einem Absterben zu bewahren, muß daher der Trophoblast bei der in vitro Differenzierung menschlicher Blastozysten mechanisch entfernt werden (beschrieben von Thomson a.a.O.).

b) Alternative Herstellungsmöglichkeiten:

35

Die in vitro Differenzierung von ES-Zellen ist nicht der einzige Weg, um menschliche Kardiomyozyten zu gewinnen. Kardiomyo-

zyten sind ebenfalls zugänglich durch in vitro Differenzierung von Primordialzellen, Vorläuferzellen von Ei- und Samenzellen, die aus humanen fetalen Ovarien oder Testes gewonnen werden. Die Etablierung humaner pluripotenter Primordialzellen ist z.B. beschrieben bei Shamblott et al., (1998) Proc.Natl.Acad.Sci., 95, 13726.

Außerdem sind Kardiomyozyten zugänglich aus in vitro differenzierten Oozyten, welche mittels Kern-Transfer-Technik manipuliert wurden. Geeignete Methoden sind z.B. beschrieben von Wakayama, T. et al., (1998) Nature, 394, 369; sowie Wilmut, I. et al., (1997), Nature, 385, 810. Dieser Ansatz ermöglicht insbesondere eine autologe Zelltransplantation, d.h. die Möglichkeit zur Gewinnung und Transplantation körpereigener Kardiomyozyten.

Weiterhin sind Kardiomyocyten zugänglich durch Differenzierung von Knochenmarksstromazellen. Ein Verfahren zur Herstellung muriner Kardiomyocyten wird beschrieben von Makino et al., (1999) J. Clin. Invest. 103, 697.

Ein wesentlicher Punkt, der bisher noch nicht eingehend betrachtet wurde, ist die Tatsache, daß jede der zuvor erwähnten in vitro Differenzierungsmethoden zu einem Gemisch verschiedenster Zelltypen führt. So liegt beispielsweise bei in vitro differenzierten murinen ES-Zellen der Prozentsatz an myokardialen Zellen nur bei 5%. Für die in vitro Differenzierung humaner Primordial- oder ES-Zellen muß mit ähnlichen Zahlen gerechnet werden. Dies bedeutet, daß immer nur ein Bruchteil der gesamten in vitro differenzierten Zellpopulation dem gewünschten Zelltyp entspricht. Dieser Prozentsatz kann zwar durch geeignete Wachstumsbedingungen, wie der Zugabe chemischer Induktoren, eventuell verdoppelt werden, dennoch kann mit einem derartigen Zellgemisch zunächst keine erfolversprechende Zelltransplantation unternommen werden. Konventionelle Aufreinigungsmethoden sind sehr aufwendig und zeitraubend und bewirken die eingangs beschriebenen unerwünschten Veränderungen der physiologischen

Zelleigenschaften. Erst mit Hilfe des erfindungsgemäßen Ansatzes zur Markierung und Reinigung differenzierter Kardiomyozyten kann diese Problem in zufriedenstellender Weise umgangen werden.

5

Die Erfindung wird nun anhand folgender Ausführungsbeispiele und unter Bezugnahme auf beiliegende Figuren näher erläutert. Dabei zeigt

10 Figur 1 die Markierung und Reinigung ventrikulärer Kardiomyocy-

15

ten. Das für die Transfektion pluripotenter Zellen (murine bzw. humane ES- bzw. Knochenmarks-Stromazellen bzw. Primordialzellen) verwendete Expressionsplasmid enthält folgende Untereinheiten: (1) ein bi-cistronisches Gen bestehend aus einem für ventrikuläre Kardiomyozyten spezifischen CMV-MLC2v-Promotor, welcher ein verkürztes CD4-Oberflächenprotein und das therapeutisch wirksame VEGF-Gen reguliert; (2) ein durch LoxP-Sequenzen flankiertes eigenständiges PGK-Neo-Gen, welches für die Selektion der positiv transformierten Zellen verwendet wird und durch transiente Expression eines Cre-Expressionsvektor vor der Transplantation entfernt wird; und (3) ein PGK-CTLA4-Ig-Fusionsprotein-Gen, welches als eigenständige Einheit dazu beitragen soll, dem Zelltransplantat gegenüber einer vom Empfängergerewebe ausgehenden Abstoßungsreaktion Immunität zu verleihen.

30

35

Nach der Transfektion der Zellen, z.B. mittels Elektroporation, findet eine Selektion positiv rekombinierter Zellen in G418-haltigem Medium statt. G418-resistente Zellklone werden transient mit einem PGK-Cre-Expressionsplasmid transinfiziert, wodurch LoxP-flankierte artfremde Genbereiche aus dem Genom der Zelle entfernt werden, d.h. das in die Zellen eingeschleuste Genkonstrukt enthält bereits zu diesem Zeitpunkt keine dem Patienten fremden Gene mehr. Nach Herstellung von Embroid Bodies (EBs) folgt die Differenzierung der pluripotenten Zellen, u.a. zu Herzmuskel-

zellen. Das sich bildende heterogene Zellgemisch wird anschließend einer Einzelzellpräparation unterzogen. CD4-positive Zellen können daraufhin mittels anti-CD4-Antikörper markiert und über die Auftrennung in einem Magnetfeld aufgereinigt werden. Die so gewonnene Zellpopulation besteht aus ventrikulären Kardiomyozyten, welche direkt für Transplantationsstudien verwendet werden können;

Figur 2 die elektrophysiologische Charakterisierung von ventrikulären Kardiomyocyten. (A) EGFP-negative Kardiomyozyten zeigen das typische Aktionspotential früher Zellen mit einem depolarisierten Membranpotential von ca. -56 mV und einem nur kurz anhaltendem Aktionspotential über ca. 86 ms. Außerdem zeigen sie einen negativen chronotropischen Effekt gegenüber Behandlung mit dem muscarinischen Agonisten Carbachol (CCh). (B) EGFP-positive Kardiomyozyten hingegen zeigen typische Eigenschaften des ventrikulären Typs: Negatives Membranpotential von ca. -70 mV und eine Dauer des Aktionspotentials von ca. 118 ms. Sie zeigen eine klar erkennbare Plateauphase, welche durch einen langanhaltenden Calcium-Einstrom durch Calcium-Kanäle des L-Typs hervorgerufen wird. CCh zeigt keinen Effekt auf ventrikuläre Kardiomyozyten. Eine Behandlung mit dem beta-adrenergen Agonisten Isoprenalin (Iso) führt jedoch, wie in (C) gezeigt, zu einer Verlängerung des Aktionspotentials, wiederum typisch für Kardiomyozyten des ventrikulären Typs.

Soweit keine gesonderten Angaben gemacht werden, erfolgt die Durchführung der Experimente unter Anwendung molekular- und zellbiologischer Standardmethoden (vgl. z.B. Shambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2.Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory).

35 Beispiel 1

Herstellung eines Expressionsvektors umfassend folgende Teilse-

quenzfolge:

-//CMV-MLC-2v/CD4/IRES/EGFP//PGK-Neo//PGK-CTLA4-Ig//-

Gen 1 Gen 2 Gen 3

5

1. Zunächst wird ein CMV-MCL-2v-EGFP-Plasmid hergestellt.

Das aus 590 Basenpaaren bestehende CMV-Enhancer Element (Bos-
hart et al, (1985) Cell 41, 521) wurde mittels PCR aus dem von
Clontech erhältlichen Plasmid CMV-EGFP hergestellt und an-

10 schließend über die Schnittstellen SacI, BamHI in den Expres-
sionsvektors pEGFP-1 (Clontech) kloniert (pCMV-EGFP). Um den
MLC2v-Promotor einfügen zu können wurde dieser zunächst als 2.1
kb KpnI-EcoRI DNA-Fragment aus dem Genom der Ratte isoliert

(Henderson et al., (1989) JBC. 264:18142), in die EcoRI, XhoI
15 Schnittstellen des pEGFP-1 inseriert (MLC2v-EGFP), anschließend

mittels XbaI, XhoI-Verdau aus diesem herausgeschnitten und in
die BamHI, XhoI-Schnittstellen von pCMV-EGFP eingefügt (CMV-
MLC2v-EGFP).

20 Ein CD4-Expressionsplasmid ist von der Firma Miltenyi Biotec

(Deutschland) erhältlich. Die kodierenden Bereiche des um den
intrazellulären Teil verkürzten CD4-Moleküls werden an das 3'-
Ende des CMV-MLC2v-Enhancer/Promotor-Konstrukts ligiert und,
die in 3'-Richtung folgende IRES-EGFP-Kassette wird aus einem
von der Firma Clontech bezogenen Expressionsvektor umklontiert.

Das so erhaltene bi-cistronische Gen soll die gleichzeitige
ventrikelspezifische Expression der Markergene CD4 und EGFP
garantieren. CD4 dient später der eigentlichen Aufreinigung der
Kardiomyozyten. EGFP dient zur Charakterisierung der durch die
30 Reinigung erhaltenen Zellen. Der oben dargestellte Vektor ent-
hält außerdem ein eigenständiges PGK-Neo-Gen, sowie ein von der
Arbeitsgruppe Gainer et al., (1997) Transpl. 63, 1071 beschrie-
benes CTLA4-Ig-Fusionsgen.

35 Als Kontrollvektor, um später in der Maus bzw. der Ratte die
biologische Wirkung von CTLA4-Ig, zu bestimmen, kommt zusätz-
lich ein identischer Vektor ohne PGK-CTLA4-Ig-Kassette zum Ein-

satz.

2. Der oben abgebildete, aus 3 Genen zusammengesetzte Vektor wird linearisiert und mittels Elektroporation in murine ES-Zellen und Knochenmarks-Stromazellen des Menschen bzw. der Ratte transfiziert. Über Perkollgradienten aufgereinigte humane monokleäre Knochenmarkszellen können von der Firma CellSystems bezogen werden. Knochenmarks-Stromazellen der Ratte werden in an sich bekannter Weise aus den Oberschenkelknochen von Wistar-Ratten isoliert und über einen Perkollgradienten gereinigt.

Die Zellen werden in gelatinisierten Petrischalen gehalten, wobei die ES-Zellen bei 37°C, die Knochenmarks-Stromazellen bei 33°C kultiviert werden. Über die Neomycin-Resistenzkassette lassen sich transformierte Zellen selektionieren. Bei Geneticin (G418)-resistenten ES-Zellklonen wird daraufhin entsprechend der Angaben in der W0 96/16163 durch den Entzug von LIF die Differenzierung induziert. Circa 25 Tage nach Beginn der Differenzierung erfolgt die Reinigung CD4-exprimierender Kardiomyozyten aus den gebildeten Embryoid Bodies.

Analog dem von Makino et al. a.a.O, für murine Stromazellen optimierten Protokoll wird auch bei Stromazellen der Ratte und des Menschen die Differenzierung durch die Gabe von 5'-Azacytidin angeregt.

3. Für die Reinigung CD4-exprimierender Kardiomyozyten muß zunächst eine Einzelzellpräparation aus den Embryoid Bodies hergestellt werden. Die typischerweise dafür eingesetzten Enzyme Kollagenase bzw. Trypsin können nicht verwendet werden, da sie das verwendete CD4-Oberflächenmolekül abbauen würden. Abhilfe schafft eine nicht-enzymatische Zelldissoziationslösung, die z.B. von Sigma erhältlich ist. Einzelzellen werden anschließend mit anti-CD4-Antikörpern inkubiert. Die Antikörper binden an ihr entsprechendes Antigen und markieren somit alle CD4-exprimierenden Zellen. Da die Antikörper ihrerseits an paramagnetische "Mikrobeads" gekoppelt sind, ist es möglich,

den Komplex bestehend aus CD4-exprimierendem Kardiomyozyt, anti-CD4-Antikörper und "Mikrobead" in an sich bekannter Weise über ein externes Magnetfeld zu isolieren.

- 5 Die durch paramagnetische "Mikrobeads" markierten Zellen werden in einer von der Firma Miltenyi Biotec gelieferten Säule dem Feld eines starken Magneten ausgesetzt. Das Säulenmaterial besteht aus ferromagnetischen Partikeln, welche mit einer zellfreundlichen hydrophilen Beschichtung versehen sind. Die durch
- 10 "Mikrobeads" markierten Zellen verbleiben zunächst auf der Trennsäule, während nicht markierte Zellen ausgewaschen werden. Das Abschalten des Magneten führt schließlich zur Elution der markierten Zellen. Die gesamte Reinigung dauert ca. 1-2 Stunden. Ein Ablösen der paramagnetischen "Beads" von der Zello-
- 15 berfläche ist auf Grund ihrer geringen Größe und ihrer Zusammensetzung (Eisenoxid und Polysaccharid) nicht nötig. Die Auftrennung ist daher deutlich schneller und zellschonender als die Auftrennung über den Zellsorter.
- 20 4. Die Ausbeute und Beschaffenheit der gereinigten Zellen wird anschließend über die Expression der EGFP-Kassette durch FACS-Analyse bzw. Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Expression von CTLA4-Ig läßt sich mittels monoklonaler anti-CTLA4-Ig-Antikörper und indirekter Immunfluoreszenz ebenfalls in der FACS-
- 25 Analyse bzw. im ELISA nachweisen.

Beispiel 2

- Herstellung eines Expressionsvektors umfassend folgende Teilsequenzfolge:
- 30

--//CMV-MLC-2v/CD4/IRES/VEGF//PGK-Neo//PGK-CTLA4-Ig//--

- In analoger Weise wie in Beispiel 1 beschrieben wird ein Konstrukt hergestellt, das anstelle der EGFP-Kassette das therapeutische VEGF-Gen (Carmeliet, P., et al. (1999) Nature Med. 5, 495) umfasst. Die auf diese Weise genetisch veränderten Kardi-
- 35

myozyten fungieren dann als "Carrier", um den Angiogenesefaktor lokal im Myokard zu applizieren.

Bei der therapeutischen Verwendung VEGF-exprimierender Plasmide sollen, um eine Immunreaktion des Körpers zu minimieren, alle im transgenen Expressionsvektor vorhandenen Gene humanen Ursprungs sein. Dies wiederum bedeutet, daß neben dem bereits ersetzten EGFP-Gen auch das noch vorhandene bakterielle Neo-Resistenzgen entfernt werden muß. Die für die Entfernung fremder Gene verwendete Strategie wird in Figur 1 verdeutlicht. Im dargestellten, für therapeutische Ansätze verwertbaren Expressionsvektor, ist die Neo-Kassette durch nicht kopierende sogenannte LoxP-Signalsequenzen flankiert. Werden Transgen-positive ES- bzw. Stromazellen noch vor der Differenzierung in Kardiomyozyten transient mit einem Cre-Expressionsvektor (PGK-Cre) transfiziert, so werden durch die Aktivität der Cre-Rekombinase LoxP-flankierte Genbereiche aus dem Genom entfernt, wobei eine der LoxP-Sequenzen im Genom verbleibt. (Selbert, S. (1999) BIUZ, 29, 70).

Patentansprüche

1. Expressionskassette dadurch gekennzeichnet, dass sie unter
5 der genetischen Kontrolle eines organ- oder gewebespezifischen Promotors sowie gegebenenfalls eines oder mehrerer weiterer regulatorischer Elemente 3'-stromabwärts vom Promotor die kodierende Nucleotidsequenz wenigstens eines nicht-immunogenen, an der Zelloberfläche lokalisierenden
10 Rezeptors umfasst.
2. Expressionskassette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die kodierende Nucleotidsequenz des Rezeptors in einem poly-cistronischen Gen enthalten ist, welches außer-
15 dem die kodierende Sequenz für wenigstens ein Markergen oder wenigstens ein erstes therapeutisches Gen umfasst.
3. Expressionskassette nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das poly-cistronische Gen ein bi-cistronisches
20 Gen ist und die regulatorische Sequenz einer Internal Ribosome Entry Side (IRES) umfasst.
4. Expressionskassette nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Rezeptor Affinität zu einem Liganden besitzt.
5. Expressionskassette nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein Oberflächenantigen ist, das immunologische Affinität zu einem gegebenenfalls immobilisierten Immunglobulin-Molekül besitzt.
30
6. Expressionskassette nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Oberflächenantigen das CD4-Antigen oder ein verkürztes Fragment davon, vorzugsweise dessen extrazelluläre und Transmembran-Domäne, ist.
35
7. Expressionskassette nach einem der Ansprüche vorhergehen-

den Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie außerdem ein reversibel integriertes Resistenzgen umfasst.

- 5 8. Expressionskassette nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Resistenzgen durch LoxP-Sequenzen flankiert wird.
9. Expressionskassette nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Markergen das EGFP-Gen ist.
- 10 10. Expressionskassette nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß sie außerdem ein zweites therapeutisches Gen umfaßt.
- 15 11. Expressionskassette nach Anspruch 2 oder 10; dadurch gekennzeichnet, dass das erste und zweite therapeutische Gen unabhängig voneinander ausgewählt sind unter Genen für Angiogenese-Faktoren, wie insbesondere dem vascular endothelial growth factor (VEGF) Gen, dem basic fibroblast growth factor (bFGF) Gen, dem acidic fibroblast growth factor (aFGF) Gen, dem Angiopoietin-, Activin- oder Follicostatin-Gen, und Immunsuppressionsgenen, wie insbesondere dem CTLA4-Ig Fusionsgen.
- 20 12. Expressionskassette nach einem der vorhergehenden Ansprüche, deren kodierenden Sequenzen im wesentlichen für humane oder humanisierte Genprodukte kodieren.
- 30 13. Expressionskassette nach einem der vorherigen Ansprüchen, dadurch gekennzeichnet, dass als organ- oder gewebespezifischer Promotor der ventrikelspezifische Myosin-Leichte-Kette-2 (MLC-2v) Promotor verwendet wird.
- 35 14. Expressionskassette nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass sie in 5'-3'- Richtung wenigstens eine der folgenden Teilsequenzenfolgen umfasst:

- a) MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor;
- b) CMV-Enhancer, MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor;
- 5 c) CMV-Enhancer, MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor, PGK-Promotor, CTLA4-Ig Fusionsprotein; und
- d) CMV-Enhancer, MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor, LoxP, 10 PGK-Promotor, Resistenzgen, LoxP, PGK-Promotor, CTLA4-Ig Fusionsprotein.

15. Expressionskassette nach einem der Ansprüche 13 bis 14, deren kodierenden Sequenzen im wesentlichen für humane 15 oder humanisierte Genprodukte kodieren.

16. Vektor, umfassend eine Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 12.

- 20 17. Vektor, umfassend eine Expressionskassette nach einem der Ansprüche 13 bis 15.

18. Verfahren zur Isolierung in vitro differenzierter organ- oder gewebespezifischen Körperzellen eines Säugers, wobei man

- a) in pluripotente Vorläuferzellen, ausgewählt unter embryonalen Stammzellen, Primordialzellen und Knochenmarks-Stromazellen eines Säugers, einen organ- oder gewebespezifischen Expressionsvektor nach Anspruch 16 einbringt;
- b) transgenpositive Zellen selektioniert;
- c) aus den selektionierten Zellen gegebenenfalls vorhandene Resistenzgene entfernt;
- 30 d) in den so erhaltenen Zellen die Differenzierung zu einer die gewünschten organ- oder gewebespezifischen Körperzellen umfassenden Zellpopulation induziert und 35

erforderlichenfalls eine Einzelzellpräparation herstellt; und

- e) die Rezeptor-exprimierenden differenzierten Körperzellen mit Hilfe Rezeptor-spezifischer Liganden affinitätsreinigt.

19. Verfahren zur Herstellung von ventrikulären Kardiomyozyten, wobei man

- a) in pluripotente Vorläuferzellen, ausgewählt unter embryonalen Stammzellen, Primordialzellen und Knochenmarks-Stromazellen eines Säugers, einen ventrikelspezifischen Expressionsvektor nach Anspruch 17 einbringt;
- b) transgenpositive Zellen selektioniert;
- c) aus den selektionierten Zellen gegebenenfalls vorhandene reversibel integrierte Resistenzgene entfernt;
- d) in den so erhaltenen Zellen die Differenzierung zu einer Kardiomyocyten umfassenden Zellpopulation induziert und erforderlichenfalls eine Einzelzellpräparation herstellt; und
- e) die Rezeptor-exprimierenden differenzierten ventrikulären Kardiomyozyten mit Hilfe Rezeptor-spezifischer Liganden affinitätsreinigt.

20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß man als reversibel integrierte Resistenzgene LoxP-flankierte Resistenzgene verwendet, und zur Entfernung dieser die Zellen mit einem Cre-Rekombinase kodierenden Expressionsvektor transient transfiziert.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die embryonalen Stammzellen gewonnen wurden aus

- a) Blastozysten oder
- b) enukleierten Oocyten, in welche der Kern einer diffe-

renzierten adulten somatischen Körperzelle transfert wurde.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Rezeptor-spezifischen Liganden an paramagnetische Mikrobeads gekoppelt sind und die Liganden-markierten Zellen in einem Magnetfeld von nichtmarkierten Zellen getrennt werden..
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22 zur Herstellung körpereigener (autologer) humaner Körperzellen, wobei man die pluripotenten Vorläuferzellen aus einem autologen menschlichen Spender gewinnt.
24. Transgene Kardiomyocyten mit einem elektrophysiologisch ventrikulären Eigenschaftsspektrum.
25. Transgene Kardiomyocyten nach Anspruch 24, mit einem, mehreren oder allen der folgenden elektrophysiologischen Merkmalen:
 - a) Membranpotential im Bereich von etwa $-68,6 \pm 2,8$ mV;
 - b) Membranpotentiallänge im Bereich von etwa $118,3 \pm 15,2$ ms;
 - c) Overshoot im Bereich von etwa $34 \pm 3,9$ mV;
 - d) kein Ansprechen des Membranpotentials und der Aktionspotentiallänge auf 1μ M Carbachol; und
 - e) Verlängerung des Aktionspotentials durch Gabe von $0,1 \mu$ M Isoprenalin.
26. Transgene Kardiomyocyten nach Anspruch 25, enthaltend wenigstens einen Vektor nach Anspruch 17.
27. Transgene Kardiomyocyten erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 19 bis 23.
28. Transgene Körperzellen erhältlich nach einem Verfahren

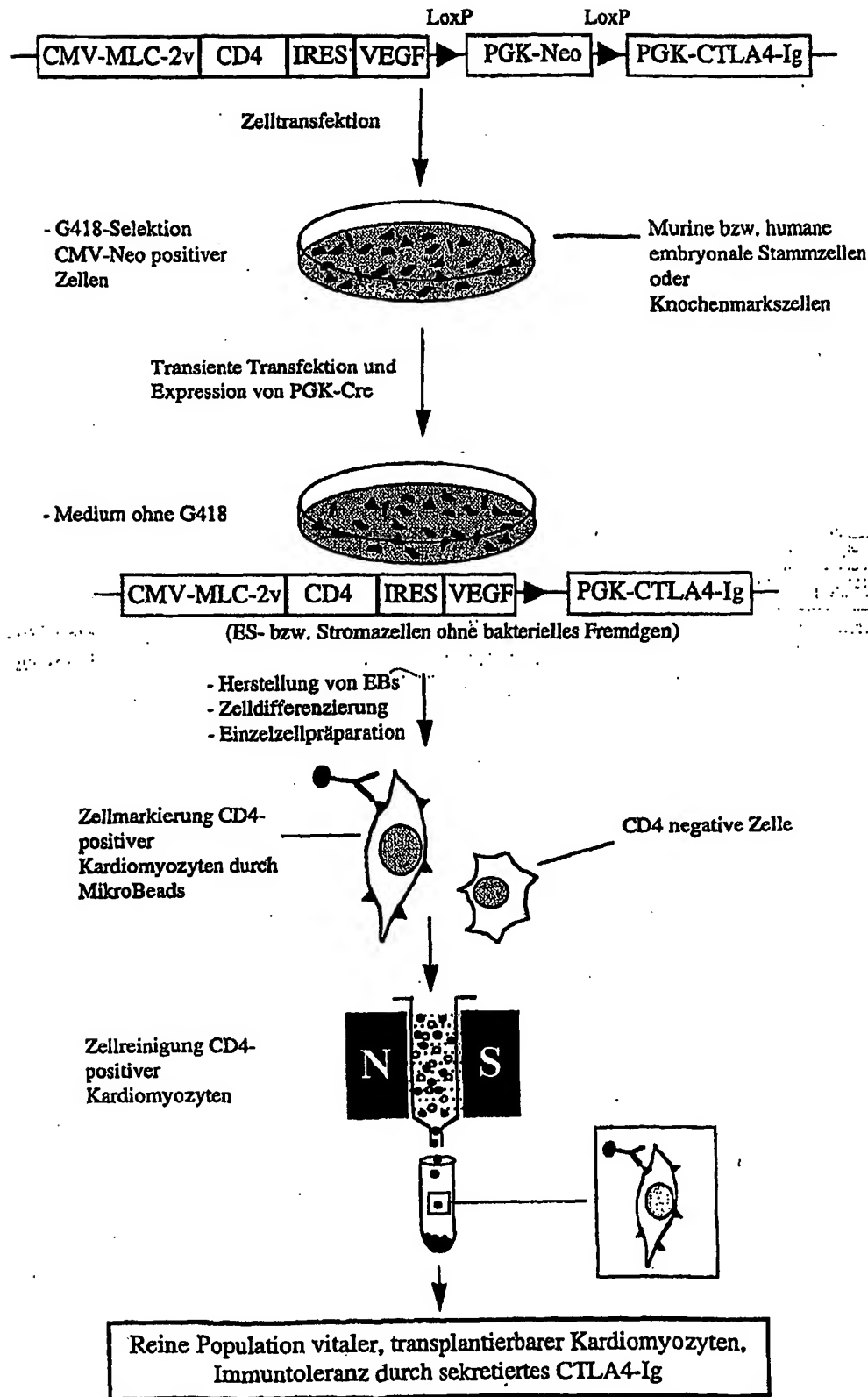
gemäß Anspruch 18 oder 20 bis 23.

29. Verwendung transgener Zellen nach einem der Ansprüche 24
bis 28 zur, vorzugsweise autologen, Zelltransplantation
oder zur Genterapie, wie insbesondere zur zellvermittel-
ten Gentransplantation.

Zusammenfassung

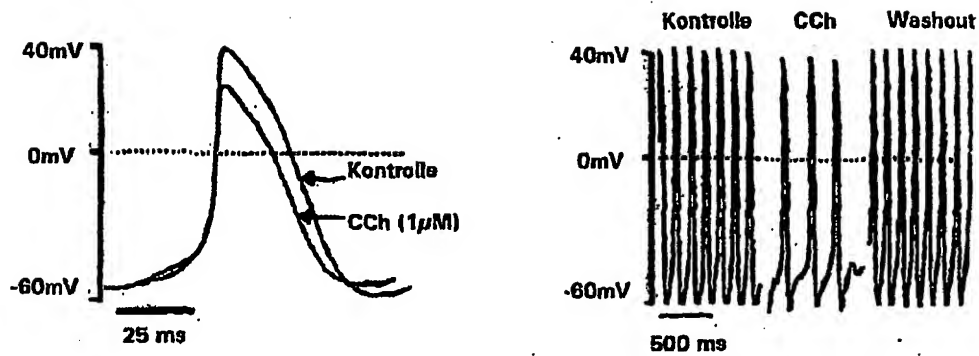
Die Erfindung betrifft eine Expressionskassette, die unter der
5 genetischen Kontrolle eines organ- oder gewebespezifischen Promotors sowie gegebenenfalls eines oder mehrerer weiterer regulatorischer Elemente 3'-stromabwärts vom Promotor die kodierende Nucleotidsequenz wenigstens eines nicht-immunogenen, an der Zelloberfläche lokalisierenden Rezeptors umfasst, die daraus
10 hergestellten Vektoren, die diese Vektoren enthaltenden Wirtszellen, Verfahren zur Reinigung differenzierter Körperzellen unter Verwendung dieser Konstrukte und die therapeutische Anwendung dieser Körperzellen.

Fig. 1



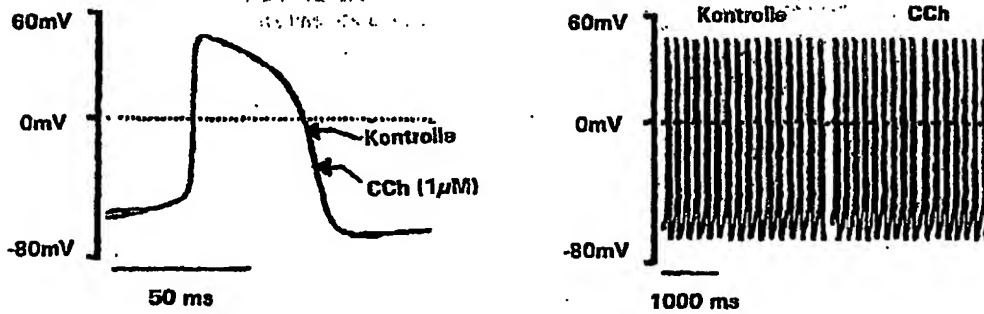
EGFP -

(A)



EGFP +

(B)



(C)

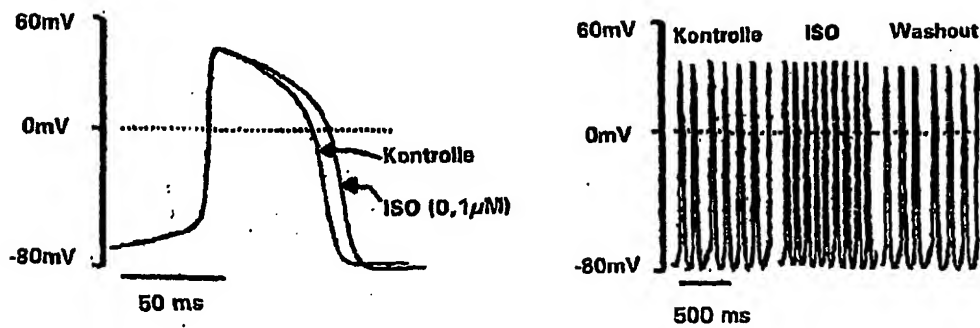


Fig. 2